



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

FACOLTÀ DI MEDICINA E FARMACIA

Tesi di Dottorato

**“ANALISI FENOTIPICA E FUNZIONALE DEI LINFOCITI B E DELLE
CELLULE T REGOLATORIE IN PAZIENTI CON ARTRITE
REUMATOIDE NON RESPONSIVI AGLI AGENTI ANTI TNF- α IN
TRATTAMENTO CON ABATACEPT”**

Dottorato di Ricerca in Scienze Infettivologiche e Terapie Immunologiche XXV Ciclo

Direttore: Prof. Vincenzo Vullo

TUTOR

Prof. Bruno Laganà

DOTTORANDO

Dott. Andrea Picchianti Diamanti

INDICE

INTRODUZIONE.....	pag.3
ARTRITE REUMATOIDE.....	pag.6
PATOGENESI.....	pag.7
DIAGNOSI.....	pag.12
FARMACI BIOLOGICI E STRATEGIE TERAPEUTICHE.....	pag.15
LINFOCITI B E CELLULE T REGOLATORIE.....	pag.20
SCOPO DELLO STUDIO.....	pag.23
PAZIENTI E METODI.....	pag.24
RISULTATI.....	pag.28
DISCUSSIONE.....	pag.32
BIBLIOGRAFIA.....	pag.44

INTRODUZIONE

L'Artrite Reumatoide (AR) è una malattia autoimmune ad eziologia non definita, caratterizzata da un'artrite simmetrica erosiva e, spesso, da coinvolgimento extra-articolare.

Nella maggior parte dei casi la malattia è caratterizzata da un decorso cronico che, attraverso riacutizzazioni e remissioni conduce ad una progressiva distruzione delle componenti articolari, con conseguente disabilità e riduzione della qualità nonché dell'aspettativa di vita.

Negli ultimi anni la comprensione sempre più approfondita della patogenesi dell'AR ha portato allo sviluppo e all'introduzione in commercio di agenti biologici in grado di bloccare a diversi livelli la cascata di eventi patogenetici alla base della malattia. Tali farmaci si sono rivelati molto efficaci nel ridurre i segni e sintomi nonché il danno strutturale dell'AR e hanno quindi avuto un impatto fondamentale nel migliorare la prognosi di questi pazienti. I primi ad essere introdotti ed attualmente più utilizzati sono i 3 inibitori del Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α): il recettore di fusione dimerico Etanercept e i due anticorpi monoclonali anti-TNF- α , l'Infliximab chimerico e l'Adalimumab umanizzato. Tuttavia fino al 30% dei pazienti non risponde a queste opzioni terapeutiche o presenta una perdita di efficacia nel tempo; sono stati quindi realizzati altri agenti biologici: il rituximab un anticorpo monoclonale chimerico rivolto contro il CD20 espresso sulla superficie dei linfociti B, l'inibitore del co-stimolo delle cellule T abatacept e il tocilizumab inibitore del recettore per l'interleuchina-6.

In particolare l'abatacept è una proteina di fusione dimerica composta dal dominio extracellulare del CTLA-4 e dalla porzione Fc di una IgG1 umana; lega con alta affinità il complesso CD80/CD86 sulla superficie cellulare delle cellule presentanti l'antigene (APC) impedendone l'interazione con il CD28 espresso dai linfociti T; il

blocco di questo segnale co-stimolatorio induce la modulazione della risposta T cellulare.

Tale farmaco agirebbe quindi in una fase molto precoce della patogenesi dell'AR, andando a influenzare indirettamente anche l'attivazione dei macrofagi e dei linfociti B e quindi il rilascio di citochine pro infiammatorie ed autoanticorpi patogeni. L'abatacept in combinazione con Methotrexate (MTX) è indicato nel trattamento dell'AR moderata o severa in pazienti che non hanno risposto a terapia con MTX o agenti inibitori del TNF- α . L'associazione MTX/agente biologico è attualmente considerato il *gold standard* terapeutico nei pazienti con AR moderata/severa come emerge da diversi studi controllati randomizzati in doppio cieco. Per quanto concerne invece la scelta della terapia biologica nei pazienti con AR non responsivi agli agenti inibitori del TNF- α , i dati presenti in letteratura sono scarsi e contraddittori. In tale contesto, vista la crescente disponibilità di nuove opzioni terapeutiche, si rendono sempre più necessari marcatori clinici o immunologici di predittività di risposta utili ad orientare la scelta terapeutica in maniera sempre più specifica e mirata.

Le cellule CD4^{pos}CD25^{pos} definite cellule T regolatorie (Treg) naturali, vengono prodotte nel timo, rappresentano il 5-10% dei linfociti T CD4^{pos} periferici e giocano un ruolo centrale nella modulazione delle risposte immunitarie, in particolare nel mantenimento della tolleranza periferica. Alterazioni nel numero o nella funzione delle Treg sono state riscontrate in numerose malattie autoimmuni tra cui la Sclerosi Multipla e il Lupus Eritematoso Sistemico; inoltre è stato evidenziato un difetto funzionale nelle Treg dei pazienti con AR che veniva ripristinato dopo terapia con agenti inibitori del TNF- α . Infine recentemente è stata descritta una riduzione nella frequenza ed un aumento dell'attività inibitoria sulla proliferazione T cellulare dei linfociti T reg in pazienti con AR dopo terapia con abatacept. Dal momento che

L'abatacept inibisce l'attivazione dei linfociti T, è verosimile supporre che tale molecola possa indirettamente alterare anche la capacità delle cellule T di innescare l'attivazione dei linfociti B in corso di una normale risposta immunitaria; per questo è utile valutare anche la frequenza e la funzione delle sottopopolazioni B linfocitarie.

Nell'adulto le cellule B sono generate nel midollo osseo, una piccola parte di queste supera i vari livelli di selezione negativa e migra in periferia allo stadio di cellula B transizionale, per giungere poi alla milza dove si differenzia in cellula B matura. Queste ultime ricircolano nei follicoli primari della milza dove, a seguito della stimolazione antigenica ed in presenza di un'adeguata interazione con le cellule T, possono andare incontro ad un processo di maturazione dell'affinità, cambiamento dell'isotipo e proliferazione all'interno dei centri germinativi. Le cellule B esprimono diversi recettori tipo Toll (TLR), in particolare sono molto responsive a stimoli attraverso il TLR9. L'interazione tra CpG (DNA batterico non metilato) e TLR9 induce una marcata proliferazione e produzione anticorpale da parte dei linfociti B, rappresentando quindi un metodo efficiente per valutarne la funzionalità.

In questo studio è stata analizzata la frequenza e la funzione delle cellule B e Treg nel sangue periferico in pazienti con AR non responsivi a terapia con inibitori del TNF- α , prima e durante trattamento con abatacept, al fine di evidenziare eventuali correlazioni con parametri di efficacia e sicurezza.

ARTRITE REUMATOIDE

L'Artrite Reumatoide (AR) è una malattia autoimmune ad eziologia sconosciuta, che colpisce prevalentemente le piccole articolazioni diartroidali, caratterizzata da artrite simmetrica, erosiva e spesso, da coinvolgimento extra-articolare.

Nella maggior parte dei casi la malattia si caratterizza per un decorso cronico che, attraverso riacutizzazioni e remissioni, conduce ad una progressiva distruzione delle articolazioni, con perdita della normale funzione e conseguente disabilità e riduzione della aspettativa di vita. L'AR si associa infatti ad un considerevole aumento di morbidità e mortalità, oltre a rappresentare un notevole onere economico sia per il singolo individuo che per il sistema sanitario. Vi è ormai forte evidenza che l'infiammazione, il danno articolare e la conseguente disabilità, siano eventi precoci nel decorso della malattia. La possibilità di ottenere una diagnosi di AR quanto più precoce e allo stesso tempo specifica si è andata realizzando negli ultimi anni grazie all'utilizzo di nuovi strumenti diagnostici quali gli anticorpi anti-peptide ciclico citrullinato (anti-CCP), la risonanza magnetica con mezzo di contrasto e l'ecografia articolare con sonde ad alta frequenza e utilizzo del segnale Power Doppler. La comprensione sempre più approfondita della patogenesi dell'AR ha inoltre portato allo sviluppo e all'introduzione in commercio di agenti biologici in grado di bloccare a diversi livelli la cascata di eventi patogenetici alla base della malattia. Essi rappresentano senz'altro un ulteriore importante elemento che contribuisce al raggiungimento dell'obiettivo remissione.

PATOGENESI

Nonostante i numerosi sforzi prodotti dai ricercatori non è stato ancora possibile identificare l'agente patogeno che esposto dalle cellule presentanti l'antigene (APC) darebbe il via alla complessa cascata di eventi culminanti nella malattia reumatoide conclamata.

Da diversi anni, è noto come un ruolo rilevante sia svolto da fattori endogeni predisponenti; tale substrato genetico è stato ipotizzato sulla base di dati epidemiologici che evidenziavano una maggiore frequenza nello sviluppo dell'AR in coppie di gemelli ed è stata successivamente associata al complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe II, in particolare ai geni HLA-DRB1*0404 e DRB1*0401 (1)

Tra i possibili antigeni artritogenici sono invece stati chiamati in causa diversi agenti infettivi; tra questi il virus di *Epstein Barr (EBV)*, *Parvovirus B19(PV19)*, *E. coli*, *Mycobatteri*, *Streptococchi* (2-7). L' EBV è un attivatore policlonale dei linfociti B ed incrementa la produzione del Fattore Reumatoide (FR). Nei pazienti con AR è stato riportato un aumento nei valori di EBV nel liquido di lavaggio bronco alveolare, nei livelli di anticorpi verso antigeni EBV normali e citrullinati nonché cellule T citotossiche EBV-specifiche in quantità superiore rispetto ai soggetti sani. Sono inoltre presenti sequenze omologhe tra proteine HLA-DR e la glicoproteina (gp) 110 dell'EBV. Il riconoscimento da parte delle cellule T di epitopi di EBV in alcuni pazienti con HLADR4, 14 ed 1 può causare una risposta immunitaria nei confronti di cellule dette "spettatori innocenti" attraverso il meccanismo del mimetismo molecolare. Nei pazienti con AR è stata anche riportata una aumentata presenza del PV B19 identificato tramite tecniche di biologia molecolare in campioni di biopsie sinoviali (75% vs 20%). In modelli di colture cellulari di sinoviociti nella

cartilagine, l'infezione con PV incrementa significativamente la migrazione delle cellule nella matrice; topi transgenici per la proteina NS1 B19 hanno presentato maggiore suscettibilità verso l'artrite indotta dal collagene. In conclusione sembrerebbe che il genoma B19 possa non causare l'artrite ma amplificare la risposta artritogena verso stimoli ambientali. Alcuni studi si sono, inoltre, focalizzati sul possibile ruolo svolto dai "superantigeni", cioè proteine in grado di legare contemporaneamente HLA-DR e un segmento V β del recettore del linfocita T, in particolare superantigeni derivati da stafilococco, streptococco e Mycoplasma potrebbero indurre direttamente da parte dei macrofagi la produzione di citochine (8).

La patogenesi dell'AR è dunque un complesso mosaico in cui entrano in gioco meccanismi immunologici dell'immunità innata e acquisita che vanno a coinvolgere diversi distretti anatomici; tra questi le cellule della membrana sinoviale (sinoviociti), i macrofagi intimali e i linfociti T e B del sangue periferico e il cui risultato finale è la formazione di un tessuto di granulazione infiammatorio definito panno sinoviale, in grado di aggredire e distruggere la sinovia, la cartilagine e l'osso subcondrale. Il primo *step* sembrerebbe essere costituito dall' induzione della risposta immune innata attraverso il legame tra un patogeno sconosciuto e i Toll like receptors (TLRs) presenti sulle APC. I TLRs rappresentano la prima linea di difesa dalle infezioni essendo espressi su cellule sentinella dell'ospite. Tali recettori riconoscono strutture batteriche e di altri agenti infettivi e consentono il rapido rilascio di mediatori infiammatori, attivano le APC ed amplificano la risposta del sistema immune adattativo (9). Sono descritti almeno 11 TLR nell'uomo tra i quali il TLR 2 (in grado di legare i proteoglicani), il TLR3 che lega l'RNA, il TLR4 che lega i lipopolisaccaridi, ed il TLR9 che lega il DNA batterico (10,11); quando attivato il TLR innesca un segnale di trasduzione attraverso meccanismi tra i quali il fattore

nucleare $\kappa\beta$. I TLR 2, 4 e 9 sono espressi dal tessuto sinoviale reumatoide (11,12). Successivamente stimoli chemochinici porterebbero alla migrazione della APC nel microambiente sinoviale dove l'Ag viene processato e presentato al recettore per l'antigene dei linfociti T (sinoviociti tipo A) dando il via alla fase della risposta immune adattiva.

Un secondo segnale stimolatorio rappresentato principalmente dalle molecole CD80-CD86/CD28 porta all'attivazione completa dei linfociti T $CD4^{pos}$ cui può far seguito l'attivazione, proliferazione e differenziazione B cellulare grazie all'interazione CD40L/CD40 ed in presenza di stimoli citochinici appropriati (13). I linfociti B sono responsabili della produzione di autoanticorpi patogeni (fattore reumatoide, anti-CCP), citochine pro-infiammatorie (IL6/IL1/TNF- α /INF- λ), chemochine e molecole in grado influenzare il destino di altre popolazioni cellulari quali i monociti che vanno a differenziare in macrofagi ed osteoclasti (14). Queste cellule sono in grado di produrre IL1, IL8, CSF1 e TNF- α che possono amplificare l'attività infiammatoria incrementando la proliferazione dei linfociti T e B, l'angiogenesi e la proliferazione dei sinoviociti (15). Le cellule endoteliali attivate dalle citochine espongono sulle loro membrane molecole di adesione che promuovono il richiamo di cellule infiammatorie. Un ruolo di primo piano è svolto dalle chemochine molecole secrete dai sinoviociti e dalle cellule endoteliali, in grado di determinare la migrazione delle cellule infiammatorie verso la sinovia. L'interazione tra le chemochine CCL19, CCL21, CXCL13 e i loro recettori CCR7 e CXCR5 porta alla formazione di centri germinativi ectopici osservati nella membrana sinoviale dei pazienti con AR e alla conseguente maturazione e differenziazione in loco dei linfociti B (16). Recentemente è stata identificata una molecola che svolgerebbe un ruolo rilevante per l'ontogenesi e la differenziazione dei linfociti B denominata *B Lymphocytes Stimulator* (BLyS)

(17,18). Questo è un membro della famiglia del TNF, prodotto prevalentemente dalle cellule dendritiche, monociti, macrofagi, neutrofili attivati, sovraregolato dall' IFN- λ e IL-10; costituito da una struttura trimerica presente sia in forma solubile che transmembrana, è in grado di legare tre recettori: BR3, TACI, BCMA (17,18). Il ruolo di BLyS nelle cellule B e nell'autoimmunità è stato inizialmente proposto da studi su modelli murini. Topi transgenici per BLyS sviluppano aumento delle cellule B e delle immunoglobuline sieriche, elevati livelli di autoanticorpi (tra cui i dsDNA e il FR), immunocomplessi circolanti. Inoltre la concentrazione di BLyS sierico è stata trovata aumentata in pazienti con diverse malattie autoimmuni tra cui il Lupus Eritematoso Sistemico, l'AR e la Sindrome di Sjogren; inoltre il titolo di BLyS correlava con la presenza degli anticorpi anti-dsDNA, FR, anti-Ro, anti-La e anti-Scl70 (19-23).

Una volta reclutate ed attivate le varie cellule del sistema immunitario, seguono vari eventi tra cui l' attivazione dei sistemi plasmatici (coagulazione, fibrinolisi, sistema delle chinine, sistema del complemento), dismissione di enzimi lisosomiali (proteasi acide: catepsina B e D; proteasi neutre:elastasi e collagenasi), produzione di radicali liberi dell'ossigeno e metaboliti dell'acido arachidonico responsabili delle alterazioni flogistiche della microcircolazione (vasodilatazione, aumento della permeabilità vascolare). E' nell'ambiente sinoviale dunque che si giocano gli eventi più importanti della patogenesi dell'AR. La membrana sinoviale è costituita da uno strato di rivestimento interno, il lining sinoviale e dalla sottosinovia che contiene vasi sanguigni, scarsi adipociti e fibroblasti. I meccanismi sopradescritti portano ad iperplasia e neoangiogenesi del lining e accumulo nella sottosinovia di linfociti T e B, plasmacellule, macrofagi, mastcellule, cellule Natural Killer (NK) e cellule dendritiche che esita nella formazione del panno sinoviale. Lo sviluppo delle erosioni è determinato dall'azione diretta degli osteoclasti, stimolati dall'ODF (fattore di

differenziazione degli osteoclasti) e dall'IL1 prodotti nell'ambiente (24); il danno cartilagineo deriva invece dalla digestione enzimatica prodotta dai neutrofili e sinoviociti del panno sinoviale.

DIAGNOSI

L'AR è una malattia cronica caratterizzata da una sinovite simmetrica ed erosiva. E' ormai dimostrato come vi sia un picco di danno articolare e conseguente limitazione funzionale nei primi anni (30% erosioni a 1aa, 70% a 3aa) dall'inizio dei sintomi e come un intervento terapeutico precoce e mirato possa ritardare o prevenire tali manifestazioni cliniche (25,26).

La diagnosi di AR si basa sulla ricerca di 7 parametri elaborati nel 1982 dall'American Rheumatism Association (ARA) (27): rigidità articolare di almeno 1 ora, tumefazione di 3 o più articolazioni, tumefazione delle IFP, MCF e dei polsi, tumefazione simmetrica, noduli reumatoidi, positività del FR, alterazioni articolari rilevate radiologicamente (riduzione della rima articolare, osteoporosi iuxtarticolare, erosioni ossee). Per la diagnosi di AR sono necessari almeno 4 criteri presenti per almeno 6 settimane. Tali criteri non sono adatti per una diagnosi in fase precoce (con insorgenza di sintomi da meno di dodici-ventiquattro mesi) presentano, infatti una sensibilità del 50% , in quanto comprendono segni e sintomi evidenti soprattutto in fase avanzata (28,29). Per individuare in maniera più precoce i pazienti con AR, sono stati introdotti da parte dell'American College of Rheumatology (ACR) e dell'European League Against Rheumatism (EULAR) nuovi criteri classificativi per la diagnosi di AR. Tali criteri si basano sul riscontro di un processo sinovitico in almeno una articolazione e su un punteggio che prende in considerazione il coinvolgimento articolare (numero e tipo di articolazioni coinvolte), la sierologia (fattore reumatoide e anti-ccp), gli indici di flogosi e la durata dei sintomi (6 settimane) (30).

Una volta posta la diagnosi di AR è necessario esaminare 2 parametri fondamentali per indirizzare al meglio il trattamento terapeutico: l'attività e la severità di malattia. La prima indica lo stato di flogosi in atto implicando la potenziale reversibilità del processo, mentre la severità è un concetto più complesso che sta ad indicare l'esito permanente della malattia, ovvero la perdita irreversibile dello stato di salute (comprende dunque valutazione del danno articolare, disabilità lavorativa, costi sociali e mortalità). Tali parametri vengono valutati attraverso indici clinimetrici standardizzati quali il *disease activity score* su 44 (DAS44,) o su 28 (DAS28) articolazioni. Il DAS44 e il DAS28 (range 1-9 e 2-10 rispettivamente), sono calcolati considerando 4 parametri: l'indice articolare di Ritchie (soltanto per il DAS44; misurazione graduata del dolore articolare evocato dalla palpazione da parte dell'esaminatore con uno score massimo di 78), valutazione della tumefazione su 44-28 articolazioni, VES e stato globale di salute (GH) determinabile attraverso una scala visiva analogica da 0 a 100. La complessa valutazione attraverso le formule “ $0.54 \times (\text{Ritchie}) + 0.06 \times \text{SJC44} + 0.33 \log_{\text{nat}}(\text{ESR}) + 0.0072 \times \text{GH}$ ” per il DAS44 e “ $0.56 \times (\text{TJC}) + 0.28 \times \text{SJC} + 0.70 \log_{\text{nat}}(\text{ESR}) + 0.014 \times \text{GH}$ ” per il DAS28, vengono rese facilmente determinabili attraverso l'inserimento dei parametri suddetti in appositi strumenti di calcolo. Si può parlare di remissione clinica in presenza di un'attività di malattia inferiore ad 1.6 per il DAS44 e 2.6 per il DAS28, per almeno 2 mesi consecutivi (31); è evidente come dai valori ottenuti si possa valutare sia il grado di attività della malattia sia la risposta alla terapia. Un ruolo fondamentale per determinare l'attività e gravità dell'AR è altresì svolto dalla diagnostica per immagini. La radiografia convenzionale rimane un caposaldo per lo studio del danno strutturale, tuttavia tale metodica è gravata da una scarsa sensibilità nel rilevare il danno articolare precoce e dal noto rischio biologico della metodica. Per tale motivo nell'ultimo decennio hanno acquisito crescente rilevanza in ambito reumatologico, la

risonanza magnetica (RM) e l'ecografia con utilizzo del power doppler. Per la stadiazione del danno articolare in RM viene utilizzato lo score OMERACT che prende in considerazione le erosioni cui viene assegnato un punteggio da 1 a 10 in base all'entità del danno; l'edema osseo il cui punteggio va da 1 a 10 e la sinovite a livello delle articolazioni MCF dalla II alla V e del carpo assegnando un punteggio da 0 a 3 (32). L'elevata risoluzione spaziale degli ecografi di ultima generazione, i costi trascurabili, la non invasività e la possibilità di individuare le espressioni più precoci di danno anatomico (ipertrofia sinoviale, presenza di segnale Power Doppler, tenosinoviti, etc), nonché l'evoluzione di tali alterazioni nel tempo e l'instaurarsi di processi irreversibili (erosioni, etc) fanno oggi dell'ecografia articolare la metodica ideale per la diagnosi ed il monitoraggio dell'evoluzione del danno strutturale nella pratica clinica reumatologica; per contro a differenza della RM tale metodica è operatore dipendente e gli score di danno articolare sono solo parzialmente standardizzati (33,34).

FARMACI BIOLOGICI E STRATEGIE TERAPEUTICHE

I farmaci attualmente utilizzati nella gestione dei pazienti con AR, rientrano in 2 categorie principali, sintomatici (FANS e CCS) e agenti modificatori del decorso della malattia (DMARDs), questi ultimi a loro volta suddivisibili in sintetici e biologici. Tra i DMARDs sintetici rientrano l'idrossiclorochina, la sulfasalazina, il MTX, la leflunomide, l'azatioprina, e la ciclosporina A.

Negli ultimi dieci anni i progressi della biologia molecolare applicata alla ricerca terapeutica hanno dato il via ad una vera rivoluzione in ambito reumatologico con l'introduzione dei farmaci biologici in grado di agire in maniera sempre più selettiva ed efficace nella cascata di eventi patogenetici dell'AR.

I primi DMARDs biologici ad essere stati creati ed utilizzati nel trattamento dell'AR sono stati 3 antagonisti del segnale indotto dal legame TNF- α /cellule bersaglio: 2 anticorpi monoclonali di cui uno chimerico infliximab e uno umanizzato adalimumab e l'etanercept, recettore solubile completamente umano, dimerico (75 kilodalton) del TNF. Ad essi si sono poi aggiunti nuovi agenti inibitori del TNF- α : l'anticorpo monoclonale golimumab e il peghilato certolizumab; e farmaci biologici con un diverso meccanismo di azione: l'anticorpo monoclonale anti-CD20 rituximab, l'inibitore del recettore per l'interleuchina-6 tocilizumab e il modulatore del co-stimolo abatacept. L'impiego di questi farmaci, soprattutto nelle fasi precoci della patologia, ha dimostrato di poter rallentare e, in taluni casi, arrestare l'evoluzione della malattia fino ad ottenere la remissione clinica ($\text{DAS44} < 1.6$) e/o la remissione completa ($\text{DAS44} < 1.6$ e arresto del danno strutturale) (35,36).

Gli inibitori del TNF- α hanno inoltre dimostrato un buon profilo di sicurezza, tuttavia in letteratura è stato descritto un incremento di alcuni eventi avversi rispetto

alla popolazione generale, come infezioni, neoplasie, malattie demielinizzanti, reazioni immunitarie, ecc (37,38).

L'abatacept è una proteina di fusione dimerica composta dal dominio extracellulare del CTLA-4 e la porzione Fc di una IgG1 umana; lega con alta affinità il complesso CD80/CD86 sulla superficie cellulare delle cellule presentanti l'antigene (APC) impedendone l'interazione con il CD28 espresso dai linfociti T; il blocco di questo segnale co-stimolatorio induce la modulazione della risposta T cellulare (39).

Tale farmaco, agirebbe dunque in una fase molto precoce della patogenesi dell'AR, andando ad influenzare l'attivazione dei macrofagi e dei linfociti B e quindi il rilascio di citochine pro infiammatorie ed autoanticorpi patogeni (40). L'abatacept in combinazione con MTX ha trovato dapprima indicazione nel trattamento dell'AR moderata o severa in pazienti che non hanno risposto a terapia con agenti inibitori del TNF- α e attualmente anche nei pazienti *naïve* a questi ultimi (41). L'efficacia e sicurezza di tale farmaco è stata indagata in diversi trials clinici per un totale di oltre 4.000 pazienti (42,43).

In particolare, lo studio ATTAIN (*Abatacept Trial in Treatment of Anti-TNF Inadequate Responders*) (44) ha valutato l'efficacia di abatacept nei pazienti non-rispondenti agli anti TNF- α . Dopo 6 mesi di terapia è emerso che il 50% dei pazienti ha raggiunto l'ACR20 e il 10% la remissione clinica, valori che arrivano al 60% e 20% rispettivamente nell'estensione di questo studio a 24 mesi (45). Nello studio AIM (*Abatacept in Inadequate responders to Methotrexate*) (46) la risposta ACR20 a 6 mesi è stata del 68% per il gruppo abatacept rispetto al 40% del gruppo in monoterapia con mtx. Nello studio ATTEST (*Abatacept or Infliximab vs placebo, a Trial of Tolerability, Efficacy and Safety in Treating RA*) (47) il DAS₂₈ ha evidenziato delle riduzioni significativamente maggiori nei gruppi trattati con

Abatacept (-2,53) e con Infliximab (-2,25) rispetto al gruppo trattato con placebo (-1,48) a 6 mesi. A 12 mesi tale riduzione è ulteriormente aumentata nel gruppo abatacept (-2,88) rispetto all' infliximab. Il numero di EA e il numero di pazienti che hanno interrotto la terapia per EA legati al farmaco sono stati minori nel gruppo trattato con abatacept rispetto a quello trattato con infliximab. Nel complesso, questi studi hanno dimostrato un lieve aumento delle infezioni lievi-moderate nei pazienti trattati con abatacept rispetto ai pazienti trattati con placebo. Non sono emerse invece differenze per quanto riguarda le infezioni gravi. Gli EA più frequentemente riportati sono nausea, infezioni delle vie aeree superiori, cefalea e vertigini, questi ultimi spesso associati all'infusione.

Nell'ultimo decennio, la comprensione sempre più approfondita della patogenesi dell'AR, lo sviluppo di strumenti diagnostici più sensibili e la crescente disponibilità di nuove opzioni terapeutiche più selettive ed efficaci ha modificato radicalmente la gestione terapeutica dei pazienti affetti da tale patologia. Oggi diversi studi hanno infatti dimostrato come un approccio precoce (primi 2 anni dall'esordio dei sintomi) e "aggressivo" (terapie combinate immunosoppressori biologici e sintetici) permetta di ottenere i migliori risultati. Tra questi, il PREMIER ha evidenziato una remissione clinica dopo il primo anno nel 43% dei pazienti trattati con l'associazione adalimumab/MTX e una assenza di progressione radiologica nel 64% (48). Lo studio BEST (*Behandel Strategieën*) ha evidenziato un 38% di remissione e 93% di mancata progressione radiografica nei pazienti trattati con MTX e infliximab ad 1 anno (49) e infine lo studio COMET (*Combination of Methotrexate and Etanercept in active early Rheumatoid Arthritis*) che ha riportato, con l'associazione etanercept e MTX, una percentuale di remissione clinica del 50% e assenza di progressione radiologica nell'80% dopo 1 anno di terapia (50). Ulteriore supporto alla strategia per indurre una remissione sostenuta è un monitoraggio frequente dell'andamento della

malattia, con conseguente adeguamento del regime terapeutico (tight control). A tal proposito lo studio TICORA (*Tight control for Rheumatoid Arthritis*) ha evidenziato come il tasso di remissione fosse significativamente superiore in un gruppo di pazienti con AR precoce inseriti in un programma di monitoraggio intensivo (visite mensili con regolare valutazione dell'attività di malattia tramite DAS) rispetto al gruppo inserito in un monitoraggio di routine (51). Infine lo studio CAMERA (*Computer Assisted Management in Early Rheumatoid Arthritis*) ha mostrato come il sistematico monitoraggio mediante un programma decisionale di valutazione computerizzata ed un follow-up mensile consentivano di ottenere una percentuale di remissione superiore (52). Questi risultati hanno aperto scenari nuovi ed inesplorati che hanno indotto la comunità scientifica reumatologica ad aggiornare le raccomandazioni terapeutiche per ottenere un approccio farmacologico sempre più mirato e quindi efficace e sicuro nei pazienti con AR. Le ultime linee guida EULAR e della Società Italiana di Reumatologia (SIR) si sono soffermate infatti, nel corso dell'ultimo anno, su alcuni quesiti di frequente riscontro nella pratica clinica (53-55):

- 1) Quando iniziare il trattamento con farmaci biologici
- 2) Se utilizzare tali farmaci in monoterapia o in combinazione con i DMARDs sintetici
- 3) Quale biologico sia più indicato da utilizzare per primo
- 4) Se in caso di inefficacia sia più indicato passare ad un altro biologico della stessa classe (*switch*) o con un diverso meccanismo di azione (*swap*).

In risposta ai suddetti quesiti si conclude affermando che:

- 1) Il MTX può essere considerato il farmaco di riferimento, pertanto i pazienti sono candidabili alla terapia con farmaci biologici soltanto se hanno risposto in maniera inadeguata ad almeno 3 mesi di terapia con MTX, o un altro DMARD in caso di intolleranza al MTX e presentano un'attività di malattia severa o moderata; oppure in presenza di un'attività severa e fattori prognostici sfavorevoli (elevati livelli di VES/PCR, positività per anti-CCP e FR, Power doppler positivo all'ecografia articolare, precoci erosioni alla radiografia) anche in pazienti *naive* per DMARDs sintetici.
- 2) La terapia di combinazione MTX-farmaco biologico è la più efficace nel gestire i segni e sintomi della malattia nonché la progressione del danno radiologico come evidenziato da diversi studi randomizzati su ampie casistiche.
- 3) La scelta del primo biologico viene rimandata all'opinione del clinico esperto e alla *compliance* del paziente in assenza di dati di confronto che permettano indicazioni sicure.
- 4) In caso di fallimento del primo biologico non possono essere fornite attualmente indicazioni sull'approccio più efficace e sicuro data la mancanza di marcatori immunologici e clinici predittivi o comunque in grado di discriminare tra le diverse tipologie di pazienti; è stata comunque riportata una migliore risposta clinica nei pazienti con AR che hanno effettuato uno *switch* terapeutico per perdita di efficacia piuttosto che per inefficacia primaria (56). Altri Autori hanno invece riportato come attraverso lo *swap* si possano ottenere risultati più incoraggianti che rimanendo su farmaci con lo stesso meccanismo di azione (57).

LINFOCITI B E CELLULE T REGOLATORIE

Nell'adulto le cellule B sono perlopiù generate nel midollo osseo, una piccola parte di queste supera i vari livelli di selezione negativa e migra in periferia allo stadio di cellula B transizionale, per giungere poi alla milza dove si differenzia in cellula B matura. Queste ultime ricircolano nei follicoli primari della milza dove, in presenza di una stimolazione antigenica e di una adeguata interazione con le cellule T possono andare incontro ad un processo di maturazione dell'affinità, cambiamento dell'isotipo e proliferazione all'interno dei centri germinativi dando vita alle cellule B della memoria *switched* e alle cellule secernenti anticorpi ad alta affinità (plasmacellule). Queste sottopopolazioni B del sangue periferico possono essere identificate in citofluorimetria attraverso la differente espressione dei seguenti marcatori di superficie: B transizionali = $CD19^{pos}CD24^{bright}CD38^{bright}$, B mature *vergini* = $CD19^{pos}CD24^{pos}CD38^{low}$ (58); le cellule B della memoria a differenza della mature, esprimono il CD27 e a seconda che siano andate o meno incontro allo switch isotipico saranno IgMneg o pos. Le cellule B della memoria IgMpos rappresentano probabilmente una popolazione coinvolta nella risposta immunitaria primitiva e meno specifica, mentre le cellule B della memoria IgM neg (IgG-IgA, selezionate nei centri germinativi) sono le cellule effettrici dell'immunità adattiva (59). Le cellule B esprimono diversi recettori tipo Toll (TLR), in particolare sono molto responsive a stimoli attraverso il TLR9. L'interazione tra il CpG (DNA batterico non metilato che costituisce il ligando del TLR9), induce una marcata proliferazione e produzione anticorpale da parte dei linfociti B, per questo è un valido metodo per valutarne la funzionalità (60). La proliferazione B, può essere invece analizzata in citofluorimetria tramite il 5-chloromethylfluoresceina diacetato (CMFDA), un colorante vitale utilizzato per misurare le divisioni cellulari. Tale colorante infatti entra nel citoplasma cellulare e dopo un processo di acetilazione

acquisisce una fluorescenza verde che si riduce ad ogni ciclo cellulare dividendosi equamente tra le cellule figlie (61). La stimolazione con il CpG induce divisioni cellulari fino al 50% delle cellule CD19^{pos}. Le cellule B della memoria rispondono a questo stimolo dividendosi e differenziando in plasmacellule (aumento dell'espressione del CD27 e CD38 e riduzione dell'espressione del CD19), in contrasto le cellule B mature mostrano una ridotta risposta proliferativa (60-63). Le *long lived* plasmacellule CD19^{dull}CD24^{neg}CD38^{bright} sono una popolazione rara nel sangue periferico perché dopo la risposta immunitaria va ad occupare nicchie di sopravvivenza nel midollo osseo dove resta quiescente ed insensibile ai farmaci citotossici. Alterazioni nella frequenza dei linfociti B sono state recentemente descritte da Anolik nel sangue periferico di pazienti con AR in trattamento con agenti inibitori del TNF- α ; in questi soggetti è stata infatti rilevato una riduzione nel numero dei linfociti B totali e delle cellule B della memoria (64). Non esistono attualmente dati in letteratura circa l'effetto di abatacept sulle sottopopolazioni B linfocitarie.

Le cellule Treg (CD4^{pos} CD25^{pos}) sono state identificate nel 1995 da Sakaguchi e colleghi grazie ad uno studio su topi atimici o timectomizzati che non andavano più incontro allo sviluppo di disordini autoimmuni multipli T mediati (tiroidite, insulinite, gastrite etc) dopo l'inoculazione di linfociti T CD4^{pos} CD25^{pos} (65). L'elevata espressione del marker di superficie CD25 sembra essere in grado di identificare in maniera abbastanza specifica questo pool cellulare (66). Più recentemente è stato identificato un fattore di regolazione trascrizionale intracellulare, denominato FOXP3, membro della famiglia dei fattori di trascrizione leganti il DNA, che è espresso ad alti livelli dalle cellule Treg CD4^{pos} in periferia (67). Topi transgenici per questa molecola mostrano un'aumentata attività soppressoria linfocitaria indotta dall'acquisizione di un fenotipo regolatorio da parte

dei linfociti T $CD4^{pos}CD25^{neg}$ e $CD4^{neg}CD8^{pos}$. Per contro, l'assenza del gene per FOXP3 causa la sindrome IPEX (Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked) che si presenta alla nascita con diabete tipo I, anemia emolitica autoimmune, eczema e allergia alimentare, iper IgE e spesso ipereosinofilia periferica (68). Infine altri Autori hanno dimostrato come l'espressione di bassi livelli del recettore per l'interleuchina-7 (CD127) possa distinguere le cellule T attivate dalle Treg facilitandone la caratterizzazione (69). Le cellule Treg naturali, vengono prodotte nel timo, rappresentano il 5-10% dei linfociti T $CD4^{pos}$ periferici e giocano un ruolo centrale nella modulazione delle risposte immunitarie, in particolare nel mantenimento della tolleranza periferica (70). Alterazioni nel numero o nella funzione delle Treg sono state riscontrate in numerose malattie autoimmuni tra cui la Sclerosi Multipla e il Lupus Eritematoso Sistemico; inoltre è stato recentemente evidenziato un difetto funzionale nelle Treg dei pazienti con AR che veniva ripristinato dopo terapia con agenti inibitori del $TNF-\alpha$ (71-73). Infine il gruppo di Gonzales ha recentemente evidenziato una frequenza normale ma una aumentata funzionalità delle cellule Treg in pazienti con AR dopo trattamento con abatacept (74).

SCOPO DELLO STUDIO

Scopo di questo studio è valutare gli effetti della terapia con abatacept sulla frequenza e funzione delle sottopopolazioni B linfocitarie e delle cellule T regolatorie nel sangue periferico di pazienti con AR moderata/severa non responsivi agli agenti inibitori del TNF- α .

Ulteriore obiettivo è quello di identificare possibili parametri immunologici utili ad orientare la scelta della seconda terapia biologica nei pazienti resistenti agli inibitori del TNF- α in maniera più mirata e quindi più efficiente e sicura laddove oggi risulta essere sostanzialmente empirica.

Sono stati inoltre analizzati i principali parametri clinici di efficacia e sicurezza della terapia al fine di evidenziare eventuali correlazioni prognostiche.

PAZIENTI E METODI

Studio in aperto con follow-up di 6 mesi approvato dal Comitato Etico locale. Sono stati arruolati 50 soggetti; 25 pazienti con AR severa/moderata secondo i criteri EULAR (30) che non presentavano controindicazioni alla terapia con abatacept (neoplasie, infezioni in corso, gravidanza, etc), di cui 20 non responsivi a terapia con un agente inibitore del TNF- α (*non responders* primari) e 25 controlli sani. I pazienti sono stati tutti selezionati e trattati presso la Divisione di Immunologia Clinica e Reumatologia dell'Az. Osp. Sant'Andrea - Sapienza Università di Roma, in conformità con la Dichiarazione di Helsinki. I pazienti sono stati sottoposti a prelievo di 40cc di sangue venoso, previo consenso informato, al T0 (inizio terapia con abatacept) e dopo 6 mesi (T1) di terapia; tutti hanno assunto abatacept 10mg/kg fl ev 1/mese in aggiunta a MTX 10mg/sett fl ev/sc. Al T0 e al T1 sono stati valutati parametri demografici (età, sesso, durata di malattia) e clinico – laboratoristici: attività di malattia su 44 articolazioni (DAS44), eventi avversi, VES, PCR, FR. A tali tempi, presso i Laboratori di Ricerca di Immunologia dell'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù (OPBG) di Roma, è stata inoltre eseguito l'analisi fenotipica e funzionale delle sottopopolazioni B e delle cellule T regolatorie e il dosaggio di BLyS sierico.

Analisi fenotipica

Le cellule mononucleate del sangue periferico vengono separate tramite gradiente di densità Ficoll-Paque™ Plus (Amersham Pharmacia Biotech) e colorate con l'appropriata combinazione di: fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), allophycocyanin (APC), cychrome, APC-Cy7 o PE-Cy7. Tutte le analisi vengono condotte tramite un citofluorimetro FACSCanto (Becton and Dickinson, Sunnyvale, California, U.S.A.) connesso a un PC FACSDiva. Le cellule morte sono escluse dall'analisi attraverso i parametri morfologici.

Cellule T: clone UCHT1 (anti-CD3), clone RPA-T4 (anti-CD4), clone M-A251 (anti-CD25), clone UCHL1 (anti-CD45RO) e clone FN50 (anti-CD69), clone PCH101 (anti-CD127) (BD Biosciences, San Diego, CA, USA).

Cellule B: clone HIB22 (anti-CD22), clone ML5 (anti-CD24), M-T271 (anti-CD27), clone HIT2 (anti-CD38), IA6-2 (anti-IgD) (Pharmingen, San Diego, CA, USA), frammento specifico anti-IgM Fc5 α (Jackson Immuno Research Laboratories, Pennsylvania, USA).

Analisi funzionale cellule B

Le cellule mononucleate vengono colorate con 5-chloromethylfluoresceina diacetato alla concentrazione finale di 0,1 μ g/ml (CellTracker CMFDA, Molecular Probes, Eugene, OR) e poste in coltura ad una concentrazione di $2-3 \times 10^5$ cellule per pozzetto (Becton Dickinson) in terreno di coltura completo (RPMI 1640, Gibco BRL) supplementato con siero bovino fetale inattivato 10% (FBS, Hyclone Laboratories, Logan UT) per 7gg con 2.5 μ g/ml CpG-ODN (Hycult Biotechnology, Uden, The

Netherlands). La proliferazione B cellulare è stata valutata al giorno 7 tramite citofluorimetro FACSCanto (BD Biosciences) con utilizzo di un software PC FACSDiva; al settimo giorno è stata inoltre analizzata la secrezione di immunoglobuline (IgA, IgG and IgM) nel sovrinatante della coltura cellulare tramite metodica ELISA. Infine la densità ottica viene misurata a 450 nm e la concentrazione calcolata tramite interpolazione con la curva standard delle diluizioni di IgA, IgG and IgM purificate (Jackson ImmunoResearch).

Analisi funzionale cellule T regolatorie

E' stato utilizzato un saggio di proliferazione cellulare DELFIA attraverso l'impiego di 5-bromo-2'-deossiuridina (BrdU) in alternativa al trizio. Come analogo delle pirimidine, la BrdU può essere incorporato nel DNA di nuova sintesi e rilevato usando un anticorpo monoclonale marcato con europio (lantanide, detto delle terre rare). Il saggio DELFIA impiega una soluzione Fix per fissare le cellule e denaturare il DNA, una soluzione *inducer* viene utilizzata per lo sviluppo di fluorescenza. Le cellule T C4pos totali e T CD4posCD25neg sono state isolate e separate tramite *cell sorting* FACS Aria II (BD); successivamente poste in RPMI-1640 completo e stimulate con biglie anti CD3/CD28 (50 cells -1 bead) per 5 giorni. Al 4° giorno di coltura è stato aggiunto BrdU (Bromodeoxyuridina) per 20h; le cellule sono state quindi fissate e denaturate, dopo la rimozione della soluzione di fissaggio sono state poste in incubazione per 20h con l' anticorpo anti-BrdU; infine poste con *working solution* per indurre la fluorescenza dell'eupio e lette tramite fluorometro EnVision (Perkin Elmer).

Dosaggio BlyS

I livelli sierici di BLYS sono stati quantificati tramite metodica ELISA secondo protocollo. Le piastre sono state poste in incubazione *overnight* a 4°C con 2,5 µg/ml di anticorpo di capra anti-human BLYS (PeproTech, London, UK). I sieri sono stati diluiti 1/3 partendo da un campione puro e BLYS è stato riconosciuto tramite un anticorpo di capra biotinilato (PeproTech, London, UK) seguito dal perossidasi-coniugato streptavidina (Jackson ImmunoResearch Laboratories). L'intensità ottica è stata letta a 450nm e la concentrazione di BLYS calcolata tramite interpolazione con la curva standard realizzata tramite un BLYS ricombinante (PeproTech, London, UK).

ANALISI STATISTICA

Le caratteristiche dei pazienti sono state descritte per le variabili categoriche attraverso le usuali tabelle di frequenza, e per le variabili continue attraverso il calcolo di indici sintetici quali media e deviazione standard. La correlazione fra le variabili continue è stata analizzata con il metodo di Pearson. Le differenze fra i gruppi sono state sottoposte a verifica di significatività, per le variabili continue, attraverso il test parametrico (t-Student). La significatività statistica è stata considerata per $p \leq 0.05$. Tutte le analisi sono state eseguite con il software SAS per Windows (versione 8)

RISULTATI

Sono stati arruolati 20 pazienti con AR moderata/severa non responsivi a precedente trattamento con inibitori del TNF- α che iniziavano terapia con abatacept 10mg/Kg in aggiunta a MTX 10mg/sett come da protocollo, 2 di questi pazienti non hanno completato il follow-up per motivi indipendenti dalla terapia (trasferimento in altra città); sono stati inoltre successivamente valutati 5 pazienti con AR moderata/severa sottoposti a stesso regime terapeutico ma *naïve* agli agenti anti TNF- α .

Prima di iniziare la terapia con abatacept, 16/20 (80%) pazienti presentavano un'attività di malattia severa ($\text{DAS}_{44} > 3.7$) e 4/20 (20%) moderata ($2.4 < \text{DAS}_{44} < 3.6$). Dopo 6 mesi di terapia con abatacept si è osservata una riduzione significativa dell'attività di malattia media nei pazienti (DAS_{44} 4.1 vs 3; $p < 0.001$) (Tab1); in particolare 4/18 (22%) hanno mostrato una risposta clinica buona, 8/18 (44%) una risposta moderata e 6/18 (33%) una risposta insoddisfacente secondo i criteri EULAR. Conseguentemente al T1, 4 pazienti presentavano una remissione clinica/bassa attività di malattia ($\text{DAS}_{44} < 2.4$), 10 un'attività moderata, mentre 4 hanno mantenuto un'attività di malattia severa. E' stata inoltre rilevata una riduzione degli indici di flogosi mentre non si sono osservate variazioni nei livelli sierici del FR nel corso del follow-up. Non vi sono stati eventi avversi maggiori né riacutizzazioni tubercolari o insorgenza di neoplasie. Sono stati riscontrati 8 episodi infettivi minori rappresentati da 2 episodi di infezione delle vie urinarie, 2 manifestazioni da herpes simplex e 4 infezioni delle vie aeree superiori.

Il numero assoluto e la frequenza delle sottopopolazioni B linfocitarie e delle cellule Treg al tempo zero non si è discostato in maniera significativa dai valori dei controlli sani (*Tab2, Fig1*). Al T1 è stato possibile osservare un aumento non significativo nel numero dei linfociti B totali, mentre la frequenza delle diverse sottopopolazioni B e delle cellule Treg è rimasta sostanzialmente inalterata (*Tab2, Fig1*).

E' stato recentemente riportato da noi ed altri Autori, che il legame tra il CpG e il TLR9 sui linfociti B sia in grado di indurre una proliferazione e secrezione di anticorpi; in particolare nei soggetti sani, la stimolazione con CpG induce divisione cellulare nel 48,5% delle cellule B CD19^{pos}. Dopo tale stimolo inoltre le cellule B della memoria differenziano in plasmacellule, identificabili al citofluorimetro come CD19^{dull}CD24^{neg}CD38^{bright} (60,63).

I pazienti al tempo zero hanno presentato una percentuale di linfociti B presenti dopo 7gg in RPMI significativamente inferiore a quella dei soggetti sani ($p=0.05$), suggerendo che tali cellule presentino una ridotta sopravvivenza in condizioni basali. Inoltre dopo stimolo con CpG le cellule B dei pazienti hanno mostrato una scarsa risposta proliferativa (aumento non significativo dei linfociti B totali) e differenziativa (bassa frequenza di plasmacellule) suggestiva di ipo-funzionalità (*Fig2*).

A 6 mesi di terapia con abatacept (T1) è stato possibile rilevare un incremento, rispetto al T0, nei linfociti B presenti dopo 7gg in RPMI, ma soprattutto una risposta significativamente più efficiente allo stimolo proliferativo e differenziativo indotto dal CpG, come evidenziato dal raggiungimento di livelli di linfociti B totali e di plasmacellule paragonabile a quello dei controlli sani (*Fig2*).

Questo effetto di ripristino dell'omeostasi e della funzionalità B cellulare da parte di abatacept è stato confermato da uno studio in vitro su cellule di donatori sani stimulate con CpG in presenza o meno del farmaco. I linfociti B di tali soggetti hanno infatti risposto in maniera significativa e sovrapponibile allo stimolo proliferativo e differenziativo indotto dal CpG sia in presenza che in assenza del farmaco (*Fig3*).

Per quanto concerne i linfociti T, non si sono evidenziate differenze significative nella frequenza delle cellule Treg dei pazienti al T0 rispetto ai controlli sani né variazioni significative al T1 (*Tab2, Fig1*). L'analisi funzionale ha invece mostrato una ridotta attività delle Treg nei pazienti al T0 come dimostrato dalla diminuita capacità inibitoria di questa popolazione cellulare sulla proliferazione dei linfociti T CD4^{pos}; al T1 è stato possibile osservare un ripristino seppur non significativo, dell'attività funzionale di questa popolazione cellulare (*Fig4*).

Non sono state riscontrate differenze significative tra i livelli sierici di BLYS nei pazienti al T0 rispetto ai controlli sani né sostanziali modificazioni al T1.

Nell'ipotesi che le alterazioni osservate nei linfociti B dei nostri pazienti potessero derivare, almeno in parte, dall'azione inibitoria degli agenti anti TNF- α precedentemente assunti, abbiamo preso in considerazione 5 pazienti con AR moderata/severa sovrapponibili per condizioni clinico/demografiche ma *naive* per tali farmaci. I linfociti B di questi pazienti al T0 presentavano una vitalità (sopravvivenza in RPMI) ed una capacità proliferativa e differenziativa dopo stimolo con CpG, significativamente superiore ai pazienti che avevano precedentemente assunto gli inibitori del TNF- α e sovrapponibile ai controlli sani. In questi pazienti Abatacept ha mantenuto sostanzialmente invariato il quadro immunologico (*Tab3*).

DISCUSSIONE

Negli ultimi anni lo sviluppo di strumenti diagnostici più sensibili e specifici (anticorpi anti-peptide ciclico citrullinato, risonanza magnetica, ecografia articolare) e di terapie più selettive ed efficaci (DMARDs biologici) ha segnato una svolta in ambito reumatologico portando ad introdurre il concetto di AR precoce e di remissione completa. Tuttavia circa il 40% dei pazienti deve sospendere la prima terapia biologica per inefficacia primaria, perché presenta una perdita di efficacia nel tempo o per la comparsa di eventi avversi. Per tale motivo sono stati recentemente introdotti nuovi farmaci biologici con un diverso meccanismo di azione quali il rituximab, tocilizumab e abatacept. Diversi studi internazionali su ampie casistiche, hanno dimostrato la sicurezza ed efficacia di abatacept portando all'approvazione di questo agente terapeutico dapprima per il trattamento dei pazienti con AR moderata/severa non responsivi agli inibitori del TNF- α e più recentemente anche nei pz *naïve* a queste terapie (41).

Secondo le ultime indicazioni EULAR e SIR, il MTX è considerato il farmaco di riferimento nei pazienti con AR cui dovrebbe essere associato un primo farmaco biologico nei pazienti non responsivi; in caso di inefficacia, perdita di efficacia o eventi avversi, può essere utilizzato un secondo farmaco biologico (53-55).

Tuttavia dati utili ad indirizzare il clinico nella scelta tra i diversi agenti biologici risultano oggi scarsi e contraddittori. I pochi studi comparativi testa a testa e soprattutto l'assenza di validati marcatori clinici e/o immunologici predittivi di efficacia e sicurezza per i diversi farmaci biologici rende la scelta terapeutica sostanzialmente empirica.

Nel presente studio sono stati analizzati il fenotipo e la funzionalità delle diverse sottopopolazioni di linfociti B e delle cellule T regolatorie e parametri clinici di risposta/sicurezza in 25 pazienti con AR moderata/severa in trattamento con abatacept, di cui 20 non responsivi agli agenti anti TNF- α .

I nostri risultati hanno confermato l'efficacia e la sicurezza di abatacept in questa categoria di pazienti. Dopo 6 mesi di terapia si è infatti osservata una riduzione significativa dell'attività di malattia con il 66% dei pazienti che hanno mostrato una risposta clinica buona o moderata secondo i criteri EULAR (*Tab1*).

Non si sono osservati eventi avversi maggiori né riacutizzazioni tubercolari o insorgenza di neoplasie. Tali dati sono in linea con quelli dello studio ATTAIN dove viene riportata un 10% di remissione clinica e 17% di pazienti in bassa attività di malattia dopo 6 mesi di terapia con abatacept (45).

L'analisi delle sottopopolazioni linfocitarie nei pazienti con AR non responsivi agli agenti inibitori del TNF- α ha evidenziato alterazioni qualitative dei linfociti B rispetto ai controlli sani nonché un significativo ripristino di tali anomalie dopo 6 mesi di terapia con abatacept (*Fig2*). Questo effetto di ristabilimento dell'omeostasi e della funzionalità B cellulare da parte di abatacept è stato inoltre confermato da uno studio in vitro su cellule di donatori sani stimulate con CpG in presenza o assenza del farmaco (*Fig3*).

Partendo dall'ipotesi che le alterazioni riscontrate nei linfociti B dei nostri pazienti potessero dipendere almeno in parte dalla precedente terapia con anti TNF- α , è stata valutato l'effetto di abatacept in 5 pazienti con AR che non avevano mai assunto tali agenti terapeutici.

Da tale analisi è emerso come questi pazienti al T0 presentassero una capacità proliferativa e differenziativa in risposta al CpG, significativamente superiore rispetto ai pazienti che avevano precedentemente assunto inibitori del TNF- α e sovrapponibile ai controlli sani; tale condizione è rimasta pressoché invariata dopo 6 mesi di terapia con abatacept (*Tab3*).

A sostegno di queste osservazioni è utile ricordare che il TNF- α è una citochina pluripotente secreta da una grande varietà di cellule tra cui i linfociti B, è un fattore autocrino e paracrino necessario per la proliferazione dei linfociti B via CD40 e BCR (75,77). E' stato infatti dimostrato come l'attivazione delle cellule B attraverso anti Ig e CD40/IL4 aumenti l'espressione del TNF- α e la successiva proliferazione B (77); inoltre il blocco del TNF- α con anticorpi monoclonali in vitro è in grado di inibire tale proliferazione viceversa l'aggiunta di TNF- α esogeno può aumentare la proliferazione delle cellule B attivate del 25-50% (78).

Pasparakis e altri hanno dimostrato come topi KO per il TNF- α non sono in grado di generare centri germinativi efficienti e quindi cellule B follicolari (79). Infine recentemente Anolik ha evidenziato una alterazione nella funzione dei linfociti B, in particolare delle cellule follicolari dendritiche, in pazienti con AR trattati con inibitori del TNF- α (64).

Un altro dato da sottolineare emerso dal presente studio è la correlazione diretta riscontrata tra la risposta al farmaco e la vitalità/funzionalità dei linfociti B al tempo zero. I pazienti che non hanno risposto in maniera soddisfacente ad abatacept infatti non hanno mostrato differenze nei parametri clinico/demografici rispetto agli altri soggetti ma presentavano una vitalità e funzionalità dei linfociti B inferiore rispetto ai pazienti responsivi al farmaco. Anche in questi pazienti si è avuta un

miglioramento di tali alterazioni al T1 che tuttavia è rimasto inferiore rispetto agli altri pazienti.

Non si sono evidenziate differenze significative nella frequenza delle cellule Treg dei pazienti al T0 rispetto ai controlli sani, né rispetto al T1 (*Tab2, Fig1*). La funzionalità delle cellule Treg è invece apparsa ridotta nei pazienti prima della terapia con abatacept come evidenziato dalla diminuita capacità inibitoria di questa popolazione cellulare sulla proliferazione dei linfociti T CD4pos. Ehrnstein ha precedentemente riportato una ridotta funzionalità delle Treg e il suo parziale ripristino dopo terapia con agenti inibitori il TNF- α in pazienti con AR responsivi ad infliximab (73). Se si considera che i pazienti della nostra casistica avevano ricevuto una precedente terapia con antagonisti del TNF- α ma senza raggiungere una risposta clinica adeguata appare evidente come questi risultati immunologici, apparentemente in contrasto con Ehrnstein, sono invece una conferma della correlazione diretta che intercorre tra efficacia clinica degli anti TNF- α e ripristino della funzionalità delle Treg. Infine, in accordo con quanto riportato da Gonzales tale disfunzionalità delle Treg è stata significativamente ripristinata dopo 6 mesi di terapia con abatacept (74) (*Fig4*).

In conclusione questo studio conferma l'efficacia e la sicurezza di abatacept nei pazienti non responsivi agli agenti inibitori del TNF- α . Dimostra che in questi pazienti tali farmaci non sono stati in grado di modificare positivamente l'assetto funzionale dei linfociti T regolatori ed è il primo lavoro ad evidenziare una ridotta funzionalità dei linfociti B che viene risolta dalla terapia con abatacept, un agente biologico con un diverso meccanismo di azione. Se confermato su una casistica più ampia questo dato avrebbe importanti risvolti clinici perché potrebbe fornire parametri immunologici utili nel ponderare la scelta della terapia biologica nei

pazienti con AR resistenti agli inibitori del $\text{TNF-}\alpha$, in maniera più mirata e quindi più efficiente e sicura.

TABELLE

Tabella 1. Parametri demografici, clinici e sierologici dei 20 pazienti non responsivi agli inibitori del TNF- α al tempo 0 (T0) e dopo 6 mesi di terapia con abatacept (T1).

Pts	Età	Durata Malattia (aa)	Terapia Precedente	VES ^s (mm/h)		PCR (mg/l)		DAS ₄₄ [*]	
				T0	T1	T0	T1	T0	T1
1	30	2	IFX	11	9	0,5	1	3,8	2,4
2	42	14	ADA	21	9	17	3	3,9	2
3	54	7	ETN	13	25	5,2	1,1	3,8	1,2
4	70	20,5	ETN	17	13	6	5	3,6	3
5	71	5	ADA	35	16	1,5	5	4,6	2,8
6	68	7	IFX	26	18	5	3	4,6	2,8
7	56	10	GOL	8	6	3	3	4	3,2
8	68	11	ETN	46	27	12	7	5,4	3,8
9	65	20	ADA	40	58	20	22	5	3,3
10	55	8	ETN	81	6	1,2	3	3,3	3,2
11	62	16	IFX	52	7	40	5	4	2,6
12	72	8	ETN	6	24	0	0	3,8	2,4
13	61	13	ETN	57	52	11	6	4,5	4,6
14	60	6	IFX	28	20	3	3	4,9	4,2
15	57	4	ADA	22	12	19	6	3,1	3
16	61	20	IFX	15	30	2	17	3,9	3,2
17	47	8,5	ADA	40	15	6	0,4	4,4	4,3
18	49	2	GOL	54	24	22	2	3,7	3
19	60	8	ETN	40	/	12	/	4	/
20	52	6	ADA	28	/	8	/	4,1	/
Media	58	9,8		32	20,6	9,7	5,1	4,1	3
SD	10,1	5,4		18,5	13,8	9,4	5,3	0,5	0,8

Etn = Etanercept, ADA = Adalimumab, IFX = Infliximab, GOL = Golimumab
p = 0.05 (VES media T0 vs T1); p < 0.001(DAS medio T0 vs T1)

Tabella 2. Analisi fenotipica e numero assoluto dei linfociti B e cellule T regolatorie (Treg) nei controlli sani e nei pazienti al tempo zero (T0) e dopo 6 mesi di terapia con abatacept (T1)

	Linfociti B				Treg
	Totali	Memoria	Mature	Trans	
Controlli (20)	17±8(320)	41±20(140)	55± 21(170)	4±2(12)	3± 2(32)
Pazienti T0 (20)	12±6(268)	27±15(75)	67±13(175)	5±2(13)	2± 2(24)
Pazienti T1 (18)	13±9(312)	25±12(70)	68±12(220)	7±3(22)	2± 2(30)
P value (T0vsT1)	ns	ns	ns	ns	ns

Dati espressi come percentuale \pm deviazione standard e numero medio/ul. La percentuale delle sottopopolazioni B è da considerarsi all'interno dei B totali, quella delle cellule Treg all'interno dei linfociti T CD4^{pos}.

Tabella 3. Proliferazione e differenziazione dei linfociti B in RPMI e dopo stimolo con CpG, nei controlli sani e nel gruppo dei 5 pazienti *naive* per inibitori del TNF- α al tempo zero (T0) e dopo 6 mesi di terapia con abatacept (T1)

	Linfociti B		Plasmacellule	
	RPMI	CpG	RPMI	CpG
Controlli	12 \pm 4	21 \pm 9	3 \pm 2	27 \pm 13
P value	0.005		0.003	
Pazienti T0 (5)	8 \pm 3	20 \pm 5	1 \pm 1	14 \pm 8
P value	ns		0.05	
Pazienti T1 (5)	11 \pm 4	25 \pm 6	6 \pm 3	26 \pm 13
P value	0.01		0.01	

Dati espressi come percentuale \pm deviazione standard

FIGURE

FIGURA 1. Analisi fenotipica delle sottopopolazioni linfocitarie B (CD24/CD38), T effettrici (CD4/CD45RO) e T regolatorie (CD25/CD127). Controllo sano (HD) e paziente prima e dopo 6 mesi di terapia con abatacept. (Trans = Transizionali, Mem = Memoria, Mat = Mature, Treg = T regolatorie).

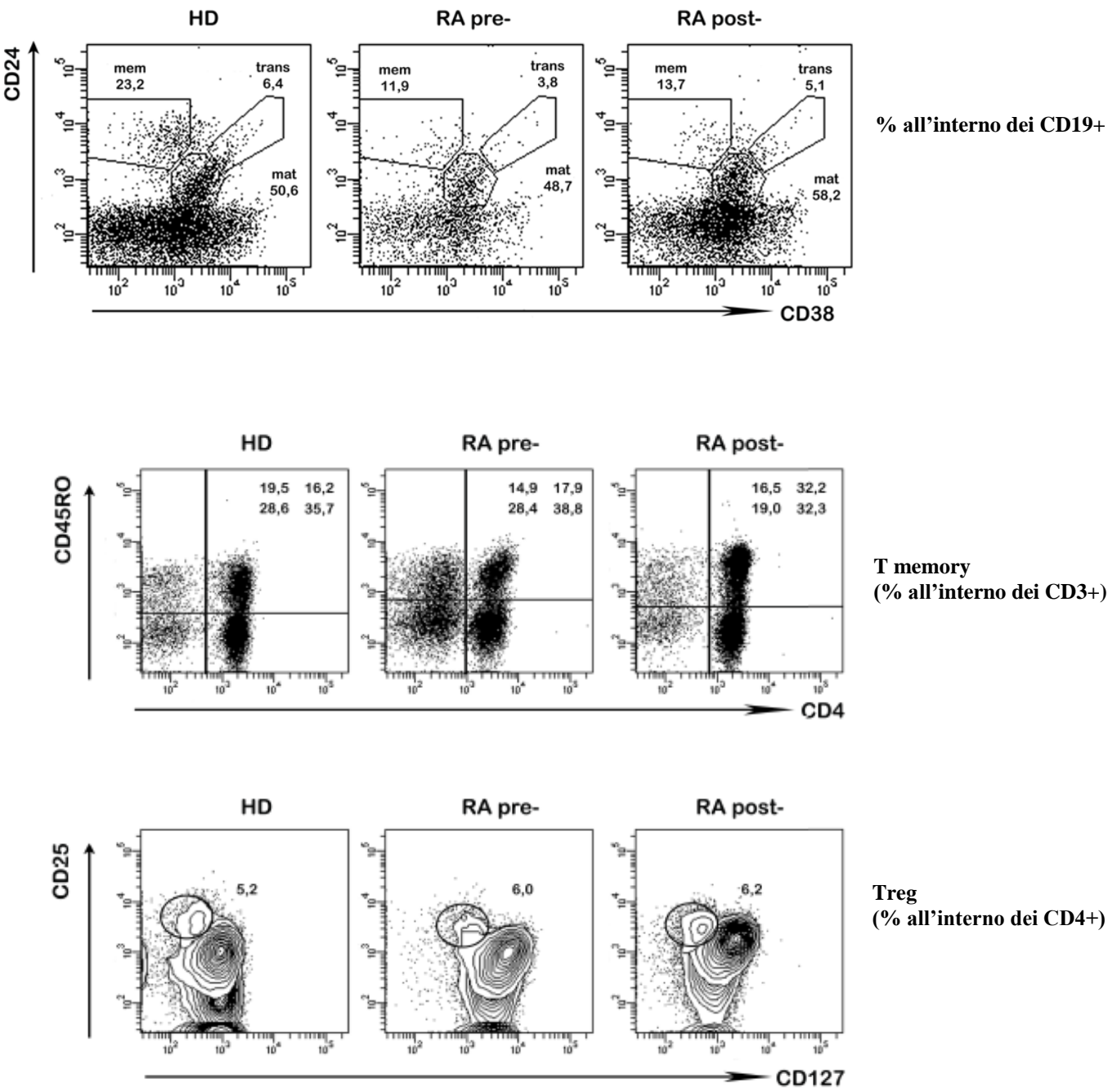


FIGURA 2. A - proliferazione (CD19/CMFDA) e differenziazione (CD27/IgM) dei linfociti B prima e dopo stimolo con CpG, in un controllo sano (HD) e in un paziente prima e dopo 6 mesi di terapia con abatacept. **B** – Proliferazione dei linfociti B prima e dopo terapia con abatacept nel totale dei pazienti (media/deviazione standard).

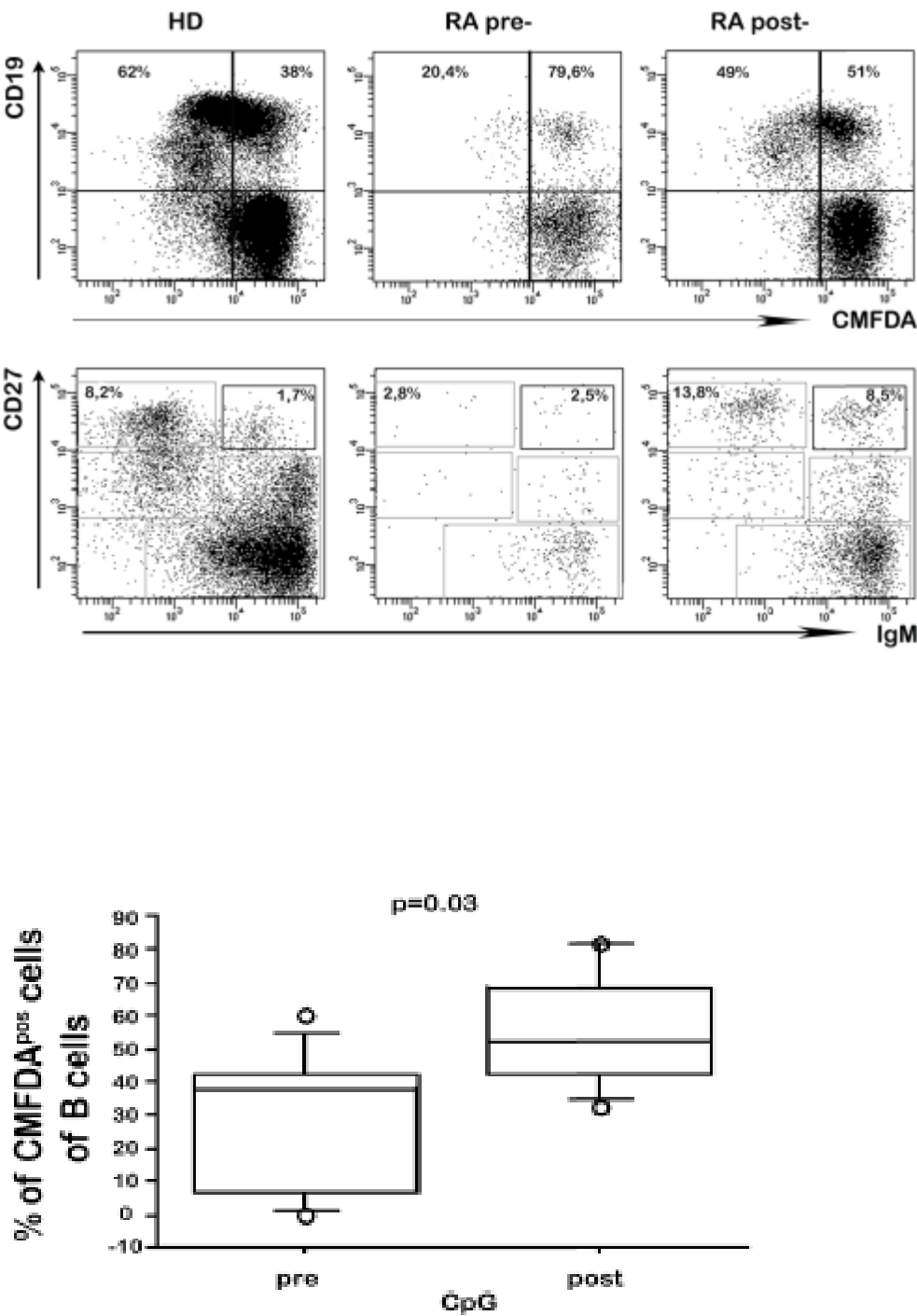


FIGURA 3. Proliferazione e differenziazione dei linfociti B in un controllo sano dopo 7gg di coltura rispettivamente in RPMI, CpG e ABATACEPT + CPG.

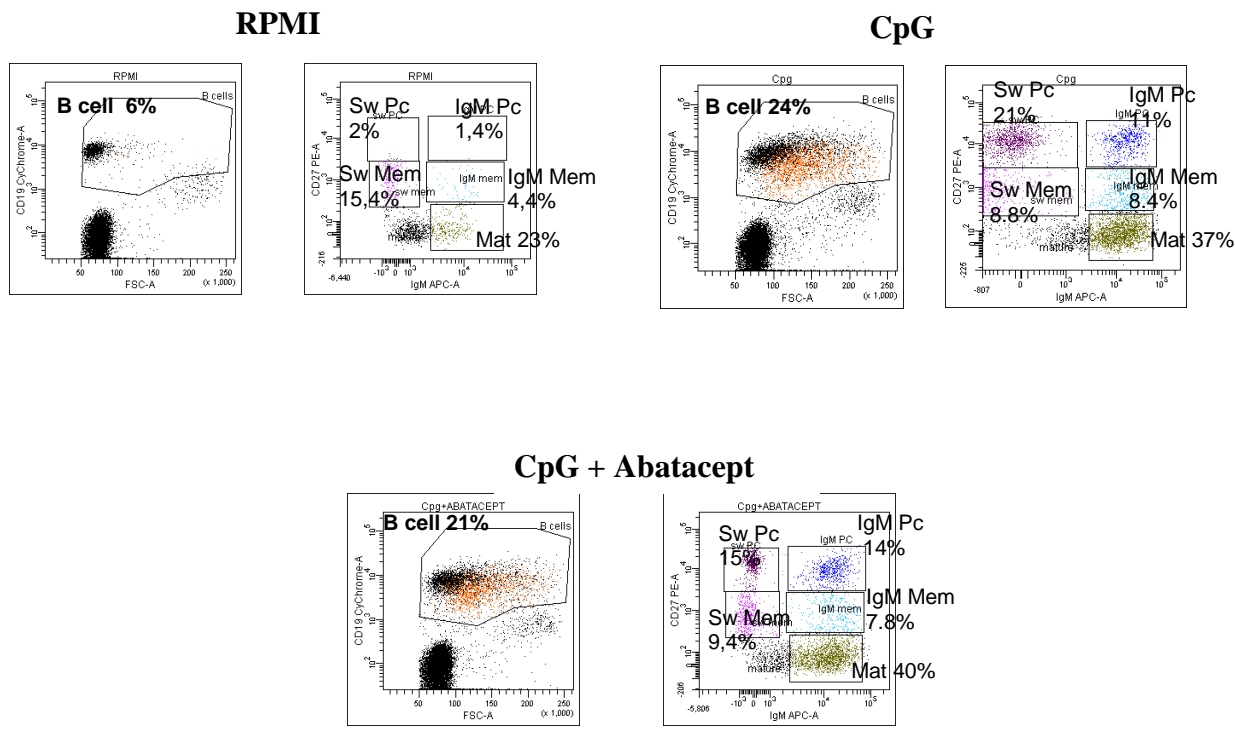
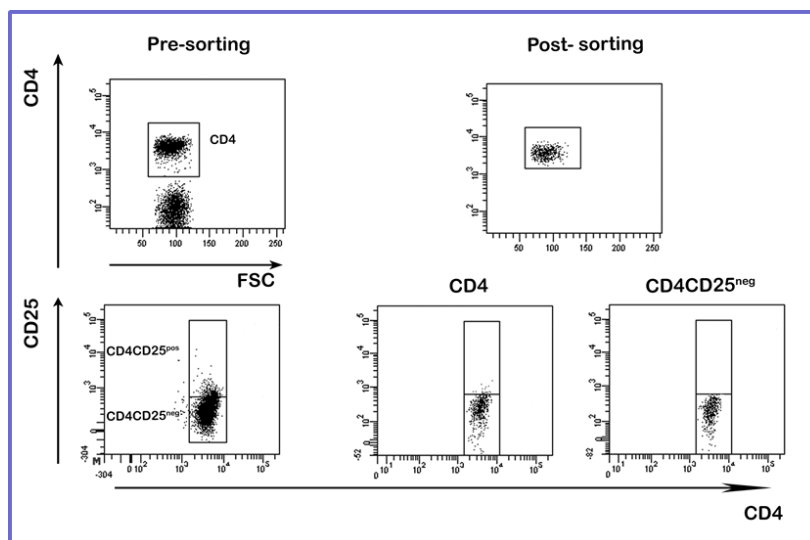
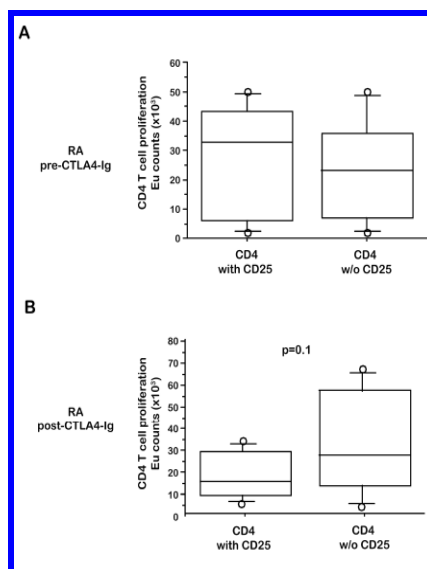
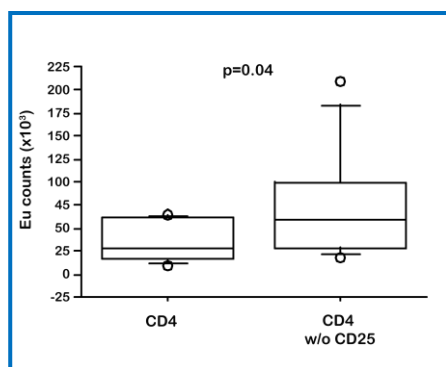


Figura 4. **A** - Separazione tramite sorting delle cellule TCD4pos e TCD4posCD25neg. **B** - Proliferazione dei linfociti T CD4pos in presenza e in assenza delle cellule T regolatorie prima e dopo 6 mesi di terapia con abatacept (CTLA4-Ig) nei pazienti con AR.

A



B



BIBLIOGRAFIA

- 1) Lanchbury JS. The HLA association with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1992;10:301-4.
- 2) Weyand CM, Hicok KC, Conn DL, et al. The influence of HLA-DR β 1 genes on disease severity in RA. *Ann Intern Med* 1992;117:801-6.
- 3) Ebringer A, Cunningham P, Ahmadi K et al. Sequence similarity between HLA-DR1 and DR4 subtypes associated with RA and Proteus/Serratia membrane haemolysins. *Ann Rheum Dis* 1992; 51:1245-6.
- 4) Sawada S, Takei M. Epstein-Barr virus etiology in rheumatoid synovitis. *Autoimmun Rev.* 2005;4:106-10.
- 5) Balandraud N, Roudier J, Roudier C. Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 2004;3:362-7.
- 6) Firestein, GS. Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. Kelly's Textbook of Rheumatology. 8. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier; 2009. p. 1035-1086.
- 7) Ray NB, Nieva DR, Seftor EA et al. Introduction of an invasive phenotype by human parvovirus B19 in normal human synovial fibroblast. *Arthritis Rheum* 2001; 44:1582-6
- 8) Paliard X, West SG, Lafferty JA et al. Evidence for the effects of a superantigen in rheumatoid arthritis. *Science* 1991;253:325-9.
- 9) Roelofs MF, Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S et al. The expression of toll-like receptors 3 and 7 in rheumatoid arthritis synovium is increased and costimulation of toll-like receptors 3, 4, and 7/8 results in synergistic cytokine production by dendritic cells. *Arthritis Rheum* 2005;52:231.
- 10) Capolunghi F, Cascioli S, Giorda E, Rosado MM, Plebani A, Auriti C, et al. CpG drives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies. *J Immunol* 2008; 180:800-8.
- 11) Radstake TR, Roelofs MF, Jenniskens YM et al. Expression of toll like receptors 2 and 4 in rheumatoid synovial tissue and regulation by proinflammatory cytokines interleukin-12 and interleukin-18 via interferon-gamma. *Arthritis Rheum* 2004;50:3856.

- 12) Joosten LA , Koenders MI , Smeets RL et al. Toll-like receptor 2 pathway drives streptococcal cell wall-induced joint inflammation: Critical role of myeloid differentiation factor. *J Immunol* 2003;171:6145.
- 13) Rissoan MC , Van Kooten C , Chomarat P et al. The functional CD40 antigen of fibroblasts may contribute to the proliferation of rheumatoid synovium. *Clin Exp Immunol* 1996;106:481.
- 14) Choy EHS, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2001;344:907-16.
- 15) Houssiau FA. Cytokines in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 1995;14(II):10-3.
- 16) Manzo A , Paoletti S , Carulli M et al. Systematic microanatomical analysis of CXCL13 and CCL21 in situ production and progressive lymphoid organization in rheumatoid synovitis. *Eur J Immunol* 2005;35:1347.
- 17) Nardelli B, Belvedere O, Roschke V, Moore PA, Olsen HS, Migone TS, et al. Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. *Blood*. 2001 1;97(1):198-204.
- 18) Benson MJ, Dillon SR, Castigli E, Geha RS, Xu S, Lam KP, et al. Cutting edge: the dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL. *J Immunol*. 2008 15;180(6):3655-9.
- 19) Mackay F, Woodcock SA, Lawton P, Ambrose C, Baetscher M, Schneider P, et al. Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med*. 1999. 6;190(11):1697-710.
- 20) Pers JO, Daridon C, Devauchelle V, Jousse S, Saraux A, Jamin C, et al. BAFF Overexpression Is Associated with Autoantibody Production in Autoimmune Diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1050:34-9.
- 21) Cheema GS, Roschke V, Hilbert DM, Stohl W. Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *Arthritis Rheum*. 2001;44(6):1313-9.
- 22) Seyler TM, Park YW, Takemura S, Bram RJ, Kurtin PJ, Goronzy JJ, et al. BLyS and APRIL in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 2005;115(11):3083-92.

- 23) Stohl W, Metyas S, Tan SM, Cheema GS, Oamar B, Xu D, et al. B lymphocyte stimulator overexpression in patients with systemic lupus erythematosus: longitudinal observations. *Arthritis Rheum* 2003;48(12):3475-86.
- 24) Jones DH, Kong YY, Penninger JM. Role of RANKL and RANK in bone loss and arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2002;61 Suppl 2:32-9.
- 25) Picchianti Diamanti A, Germano V, Ferlito C, Migliore A, D'Amelio R, Laganà B. Health-Related Quality of Life and Disability in Patients with Rheumatoid, Early Rheumatoid and Early Psoriatic Arthritis Treated with Etanercept. *Qual Life Res*. 2010;19(6):821-6.
- 26) Wick MC, Lindblad S, Weiss RJ, Klareskog L, van Vollenhoven RF. Estimated prediagnosis radiological progression: an important tool for studying the effects of early disease modifying antirheumatic drug treatment in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:134-37.
- 27) Arnett FC, Edworthy SM, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315-24
- 28) Visser H. Early diagnosis of rheumatoid arthritis. *Best practice & Research Clin Rheum* 2005; 19: 55-72.
- 29) Soubrier M, Dougados M. How to assess early rheumatoid arthritis in daily clinical practice. *Best practice & Research Clin Rheum* 2005; 19:73-89
- 30) Aletaha D, Neogi T, Silman AJ et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1580-8
- 31) van Gestel AM, van Riel PL et al. Development and validation of the European League Against Rheumatism response criteria for rheumatoid arthritis. Comparison with the preliminary American College of Rheumatology and the World Health Organization/International League Against Rheumatism Criteria. *Arthritis Rheum* 1996;39:34-40.
- 32) Conaghan P, Edmonds J, Klarlund M, et al. Magnetic resonance imaging in rheumatoid arthritis: summary of OMERACT activities, current status, and plans. *J Rheumatol* 2001;28:1158-62.

- 33) Wakefield RJ, Kong KO, Conaghan PG, Brown AK et al. The role of ultrasonography and magnetic resonance imaging in early rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21:S42-S49
- 34) Backhaus M, Ohrndorf S, Kellner H, Schmidt A. Evaluation of a novel 7-joint ultrasound score in daily rheumatologic practice: a pilot project. *Arthritis Rheum.* 2009;61:1194-1201
- 35) Nell, V, Machold KP, Ebert G et al. Benefit of very early referral and very early therapy with disease-modifying anti-rheumatic drugs in patients with early rheumatoid arthritis. *Rheumatology* (Oxford) 2004;43:906-917
- 36) Rantalaiho V, Korpela M, Laasonen L, Kautiainen H, Järvenpää S, Hannonen P, et al. Early combination disease-modifying antirheumatic drug therapy and tight disease control improve long-term radiologic outcome in patients with early rheumatoid arthritis: the 11-year results of the Finnish Rheumatoid Arthritis Combination Therapy trial. *Arthritis Res Ther* 2010;12(3):R12236)
- 37) Day R. Adverse reactions to TNF-alpha inhibitors in rheumatoid arthritis. *Lancet* 2002; 359:540-1
- 38) Hyrich K L, Silman AJ, Watson KD, Symmons DPM. Anti-tumor necrosis factor alpha therapy in rheumatoid arthritis: an update on safety. *Ann Rheum Dis* 2004; 63:1538-1543.
- 39) Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1994; 1:405-8
- 40) Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Ann Rev Immunol* 1996; 14:233-58.
- 41) Moreland L, Bate G, Kirkpatrick P. Abatacept. *Nature Rev. Drug Discov* 2006; 5:185-86.
- 42) Sibia J, Westhovens R. Safety of T-cell co-stimulation modulation with abatacept in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2007; 25:S46-56.
- 42) Maya H Buch, Edward M Vital, Paul Emery. Abatacept in the treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Research and Therapy* 2008, 10(Suppl 1):S5
- 43) Genovese MC, Becker JC, Schiff M et al: Abatacept for Rheumatoid arthritis refractory to tumor necrosis factor alpha inhibition. *N Engl J Med* 2005;353:1114-1123

- 44) M C Genovese, M Schiff, M Luggen, et al. Efficacy and safety of the selective co-stimulation modulator abatacept following 2 years of treatment in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to anti-TNF therapy. *Ann Rheum Dis* 2008;67:547-554
- 45) Kremer JM, Genant HK, Moreland LW et al. Effects of Abatacept in patients with methotrexate-resistant active rheumatoid arthritis: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2006;144:865-876.
- 46) M Schiff, M Keiserman, C Coddington, et al. Efficacy and Safety of Abatacept or Infliximab vs placebo in ATTEST: a phase III, multi-centre, randomised, double-blind, placebo-controlled study in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate. *Ann Rheum Dis* 2008;67:1096-1103.
- 47) Breedveld FC, Kavanaugh AF, Cohen SB et al. Early treatment of rheumatoid arthritis (RA) with adalimumab (HUMIRA) plus methotrexate vs adalimumab alone or methotrexate alone: the Premier study. *Arthritis Rheum* 2004;50:4096
- 48) Goekoop-Ruiterman YPM, Vries Bouwstra JK, Dijkmans BAC et al. Clinical and radiographic outcome of four different treatment strategies in patients with early rheumatoid arthritis (the best study). *Arthritis Rheum* 2005;52:3381-3390
- 49) Emery P, Breedveld FC, Freundlich B et al. Comparison of methotrexate monotherapy with a combination of methotrexate and etanercept in active, early, moderate to severe rheumatoid arthritis (COMET): a randomised, double-blind, parallel treatment trial. *Lancet*. 2008 Aug 2;372(9636):375-82.
- 50) Katchamart W, Bombardier C. Systematic Monitoring of Disease Activity Using an Outcome Measure Improves Outcomes in Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol*. 2010 May 1.
- 51) Bakker MF, Jacobs JW, Welsing PM, Utrecht Arthritis Cohort Study Group. Early clinical response to treatment predicts 5-year outcome in RA patients: follow-up results from the CAMERA study. *Ann Rheum Dis* 2011. 70(6);1099-103.
- 52) Smolen JS, Aletaha D, van der Heijde D et al. Expert Committee. Treating rheumatoid arthritis to target: recommendations of an international task force. *Ann Rheum Dis* 2010;69(4):631-7

- 53) Smolen JS, Landewè R, Breedveld FC, van der Heijde D et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann Rheum Dis* 2010;69.
- 54) Caporali R, Conti F, Alivernini S, Matucci Cerinic M. Raccomandazioni per l'utilizzo dei farmaci biologici nella gestione dei pazienti von artrite reumatoide. *Reumatismo* 2012.64;7-16
- 55) Caporali R, Sarzi Puttini P, Atzeni F, et al. Switching TNF- α antagonists in rheumatoid arthritis: the experience of the Lorhen registry. *Autoimmun Rev* 2010. 9;465-9.
- 56) Cohen SB, Emery P, Greenwald MW et al. Reflex trial group: rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti TNF- α agents. *Arthritis Rheum* 2006. 54;2793-806.
- 57) Carsetti R, Rosado MM, Wardmann H. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev* 2004;197:179
- 58) Kruetzmann S, Rosado MM, Weber H, Germing U, Tournilhac O, Peter HH, et al. Human immunoglobulin M memory B cells controlling *Streptococcus pneumoniae* infections are generated in the spleen. *J Exp Med* 2003;197:939-45.
- 59) Quah BJ, Warren HS, Parish CR. Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nat Protoc* 2007;2:2049-56.
- 60) Capolunghi F, Cascioli S, Giorda E, Rosado MM, Plebani A, Auriti C, et al. CpG drives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies. *J Immunol* 2008;180:800-8.
- 61) Weller S, Faili A, Garcia C, Braun MC, Le Deist FF, de Saint Basile GG, et al. CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:1166-70.
- 62) Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* 2002;298:2199-202.
- 63) Capolunghi F, Rosado MM, Cascioli S, Girolami E, Bordasco S, Vivarelli M, et al. Pharmacological inhibition of TLR9 activation blocks autoantibody production in human B cells from SLE patients. *Rheumatology (Oxford)* 2010.Dec49(12):2281-9.

- 64) Anolik JH, Ravikumar R, Barnard J, Sanz I et al. Cutting Edge: Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy in Rheumatoid Arthritis Inhibits Dendritic Cell Networks via Effects on Lymphoid Germinal Centers and Follicular Memory B Lymphocytes. *J Immunol* 2008;180:688-692.
- 65) Sakaguchi S, Sakaguchi, Asano N, Itoh M, Toda M. Immunologic tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 2005;155:1151.
- 66) Jiang H, Chess L. Regulation of immune responses by T cells. *N Engl J Med* 2006; 354:1166-76.
- 67) Ruprecht CR, Gattorno M, Ferlito F, Gregorio A, Martini A, Lanzavecchia A, et al. Coexpression of CD25 and CD27 identifies FoxP3⁺ regulatory T cells in inflamed synovia. *J Exp Med* 2005; 201:1793-803.
- 68) Schubert LA, Jeffery E, Zhang Y, Ramsdell F, Ziegler SF. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J Biol Chem* 2001;276:37672-9.
- 69) Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Fazekas de St. Groth B et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 2006; 203:1693–1700.
- 70) Sakaguchi S, Sakaguchi, Asano N, Itoh M, Toda M. Immunologic tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 2005;155:1151.
- 71) Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 2004;199:971-9.
- 72) Lee JH, Wang LC, Lin YT, Yang YH, Lin DT, Chiang BL. Inverse correlation between CD4⁺ regulatory T-cell population and autoantibody levels in paediatric patients with systemic lupus erythematosus. *Immunology* 2006;117:280-6.
- 73) Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Mauri C. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti TNF α therapy. *J Exp Med* 2004. 200(3);277-85.

- 74) Alvarez-Quiroga C, Abuz-Mendoza C, Doniz-Padilla L, Gonzales –Amaro R et al. CTLA-4 Ig therapy diminishes the frequency but enhances the function of T regulatory cells in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Immunol* 2011.31(4);588-95.
- 75) Via CS, Shustov A, Rus V, Finkelman FD. In vivo neutralization of TNF- α promotes humoral autoimmunity by preventing the induction of CTL. *J Immunol* 2001. 167;6821-6826.
- 76) Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature reviews Immunol* 2003.3;745-756.
- 77) Boussiotis VA, Nadler Lm, Goldfeld AE et al. Tumor necrosis factor α is an autocrine growth factor for normal human B cells. *Proct Natl Acad Sci* 1994.91;7007-7011.
- 78) Duddy ME, Alter A, Bar-ou A. Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation? *J Immunol* 2004.172(6);3422-7.
- 79) Pasparakis M, Alexopoulou, Kollias G. Immune inflammatory responses in TNF- α deficient mice: a critical requirement for TNF- α in the formation of primary B cell follicles. *J Exp Med* 1996.184;1397-1411.

*Ringrazio tutti i componenti della “Immunology Area”
dell’OPBG di Roma diretta dalla Dott.ssa Rita Carsetti
presso cui è stata svolta la parte sperimentale dello studio.
In particolare la Dott.ssa Maria Manuela Rosado,
il Dott. Ezio Giorda e il Dott. Marco Scarsella
miei mentori di citofluorimetria...e non solo.*